

EFEITO DO ÁCIDO GIBERÉLIDO (AG₃) NO ALONGAMENTO *IN VITRO* DE PLÂNTULAS DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervum* C. DC.) DURANTE A MICROPROPAGAÇÃO

Marinei Augusto Simões*
Janaína Medeiros Vasconcelos**
Janiffe Peres de Oliveira***
Renata Teixeira Beltrão****
Candida Elisa Manfio*****
Paulo Cesar Poeta Fermino Junior*****
Andrea Raposo*****

RESUMO

A pimenta longa apresenta óleo essencial rico em safrol. A micropropagação possibilita a multiplicação clonal de genótipos altamente produtivos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido giberélico (AG₃) no alongamento de plântulas de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) germinadas *in vitro* para a micropropagação. Utilizou-se brotos desenvolvidos *in vitro*, os quais foram inoculados em meio de cultura *Wood Plant Medium* (WPM), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 6 g.L⁻¹ de ágar, e ácido giberélico (0; 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 mg.L⁻¹). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições, cada uma delas composta por cinco plantas por frasco. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e de regressão. A adição do AG₃ ao meio de cultura reduziu de forma acentuada o comprimento da raiz. O número de entrenós não foi influenciado significativamente pelas diferentes concentrações com ácido giberélico. O comprimento da parte aérea foi maior na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ de AG₃. Durante a multiplicação *in vitro* de pimenta longa, o ácido giberélico induziu o alongamento caulinar.

Palavras-chave: Giberelina. Micropropagação. Crescimento *in vitro*. Pimenta Longa.

* Bolsista de DTI/CNPq - Embrapa Acre, Rio Branco, Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular. E-mail: marinei10@hotmail.com.

** Mestranda do Programa de pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia, UFAC, Rio Branco (AC). E-mail: janamv_88@hotmail.com.

*** Doutoranda do Programa de pós-graduação em Biotecnologia pela UFAM, Manaus (AM). E-mail: janiffepoliveira@hotmail.com.

**** Analista da Embrapa Acre, Rio Branco, Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular. E-mail: beltrao@cpafac.embrapa.br.

***** Professora Visitante da UFAC. Rio Branco (AC). E-mail: candidamanfio@gmail.com.

***** Professor Adjunto do Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, UFAC, Rio Branco (AC). E-mail: paulofermino@ufac.br.

***** Pesquisadora da Embrapa Acre Rio Branco, Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular. E-mail: andrea@cpafac.embrapa.br.

EFFECT OF GIBBERELIC ACID (GA₃) ON *IN VITRO* ELONGATION PLANTLETS OF LONG PEPPER (*Piper hispidinervum* C. DC) DURING MICROPROPAGATION

ABSTRACT

The long pepper presents essential oil rich in safrole. Micropropagation allows for the clonal multiplication of highly productive genotypes. The aim of this study was to evaluate the effect of gibberellic acid (GA₃) in the elongation of seedlings of long pepper (*Piper hispidinervum* C. DC.) germinated *in vitro* for micropropagation. Were used *in vitro* developed shoots, which were inoculated in culture medium Wood Plant Medium (WPM) supplemented with 30 g.L⁻¹ sucrose, 6 g.L⁻¹ agar and gibberellic acid (0; 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 mg.L⁻¹). The experimental design was completely randomized design with three replications, each replication consisted of five plants per flask. The data were subjected to analysis of variance and regression. The addition of GA₃ to the culture medium reduced significantly root length. The number of internodes was not significantly affected by different concentrations with gibberellic acid. The shoot length was greater at a concentration of 1,0mg.L⁻¹ GA₃. During *in vitro* propagation of long pepper gibberellic acid induces stem elongation.

Key words: Growth. Regulator *In vitro* Propagation. Physiological Responses. Long Pepper

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Piper hispidinervum*, conhecida popularmente como pimenta longa, é uma planta nativa da região amazônica com óleo essencial rico em safrol extraído de suas folhas e ramos finos (BERGO et al., 2005), com rendimento de até 97% (SILVA; OLIVEIRA, 2000). Este óleo pode ser convertido em butóxido de piperonila e heliotropina, compostos utilizados na fabricação de inseticidas e na indústria de fragrâncias, respectivamente.

A propagação da pimenta longa pode ser feita por sementes ou através da técnica da micropropagação clonal. As técnicas da propagação *in vitro*, ou micropropagação, permitem a produção massal de indivíduos com características genéticas desejáveis, com alto padrão de sanidade das mudas (ALVES et al. 2010; GEORGE, 1996). Ela compreende, em um sentido amplo, um heterogêneo grupo de técnicas, mediante as quais um explante é cultivado assepticamente em um meio de cultura em condições controladas (MROGINSKI; ROCA, 1991; SOUZA; JUNGHANS, 2006). Os protocolos de micropropagação de pimenta longa ainda são incipientes, destacando-se o trabalho de Silva (2010).

Uma das etapas mais críticas para o desenvolvimento de um protocolo para

regeneração de plantas *in vitro* é o alongamento dos entrenós dos explantes (DAGNINO et al., 1991). O ácido giberélico (AG_3) um hormônio que pode aumentar a divisão e a expansão de células vegetais, promovendo o alongamento de entrenós (KERBAUY, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Algumas espécies como a pereira (*Pyrus comunis*) (MELLO-FARIAS et al., 1996), a mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) Bancroft (MADEIRA et al., 2005), o copo-de-leite (*Zantedeschia aethiopica*) (RIBEIRO et al., 2009), e o pessegueiro (*Prunus cerasifera*) (ROCHA et al., 2009), apresentaram alongamento caulinar mais evidente na presença de AG_3 . Entretanto, há espécies que não respondem significativamente no alongamento caulinar sob efeito do ácido giberélico, como a unha-de-gato (*Uncaria guianensis*) (PEREIRA et al., 2006). Existem, ainda, as plantas que têm o crescimento inibido na presença de AG_3 , como a macieira (*Malus prunifolia*, Willd, Borkh) e o paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby) descritos por Machado et al. (2004) e Reis et al. (2009), respectivamente.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ácido giberélico no alongamento caulinar *in vitro* de plantas de pimenta longa durante a micropropagação.

2 METODOLOGIA

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LABMOL) da Embrapa Acre, Rio Branco-AC. Utilizados brotos desenvolvidos *in vitro* de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) estes obtidos a partir de sementes germinadas *in vitro*, coletadas no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Acre. Estas foram desinfestadas em água com detergente neutro (5 gotas/l), imersas em etanol 70% (1 min) e em hipoclorito de sódio

2,5% (20 min). Após, cada uma dessas etapas procederam-se três lavagens com água destilada e autoclavada. Em seguida, foram inoculadas em meio de cultura *Wood Plant Medium* (WPM), com metade dos sais da formulação elaborada por Lloyd e McCown (1980). Para tal, utilizaram-se frascos de 250 mL, contendo 30 mL de meio de cultura, cinco sementes por frasco e vedação com filme plástico transparente, os quais permaneceram em sala de crescimento a

25°C ± 2°C, 16 h de fotoperíodo, com intensidade luminosa de 30 μmol fótons.m⁻².s⁻¹.

Decorridos 48 dias, as plântulas foram removidas dos frascos de cultivo, com excisão das raízes e re-inoculação em meio WPM 50% com adição de AG₃: 0; 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 mg.L⁻¹. O delineamento experimental, inteiramente casualizado com cinco repetições, totalizando 25 unidades experimentais. Cada uma delas consistiu em um frasco de 250 mL, com 30 mL de

meio com cinco brotos de pimenta longa. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em sala de crescimento nas mesmas condições utilizadas inicialmente. Após 30 dias de cultivo, avaliou-se: o número de folhas, de entrenós, o comprimento da raiz e da parte aérea.

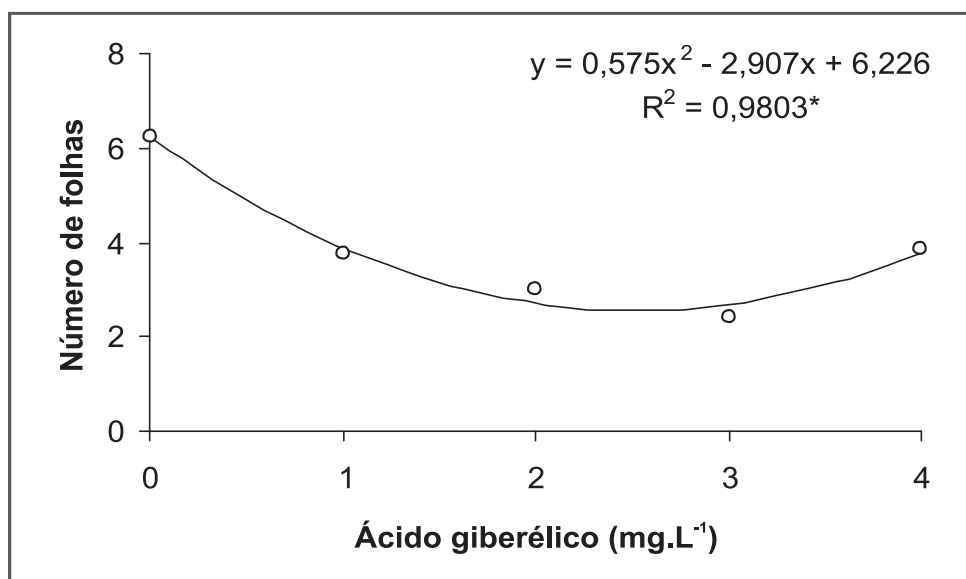
As médias foram submetidas ao teste de normalidade dos resíduos (SHAPIRO; WILK, 1965), teste de homogeneidade (BARTLETT, 1937), à análise de variância e regressão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença do AG₃ no meio de cultura reduziu significativamente ($p < 0,05$) o número de folhas de pimenta longa (Gráfico 1). Resultado semelhante foi obtido para batata-doce (*Ipomoea batatas*) que apresentou folhas menos desenvolvidas com adição de ácido giberélico ao meio de cultura (DAGNINO et al., 1991). No presente trabalho, a adição gradual de AG₃ no meio de cultura promoveu a formação de menor número de folhas até a concentração de 3,0mg.L⁻¹, acima

desta existiu tendência do aumento do número de folhas de pimenta longa, expressos pela análise de regressão com equação quadrática e coeficiente de determinação (r^2) de 0,98. Em contraste, Carvalho et al. (1998) observaram que para o cafeeiro cv. acaia (*Coffea arabica* L.) quanto maior a concentração de AG₃ maior a emergência de folhas. Já Ribeiro et al. (2009) não relataram diferenças entre as diferentes concentrações de AG₃ e o número de folhas no copo-de-leite.

Gráfico 1 - Respostas fisiológicas com relação ao número de folhas em plântulas de *P. hispidinervum* em diferentes concentrações de ácido giberélico (AG₃).



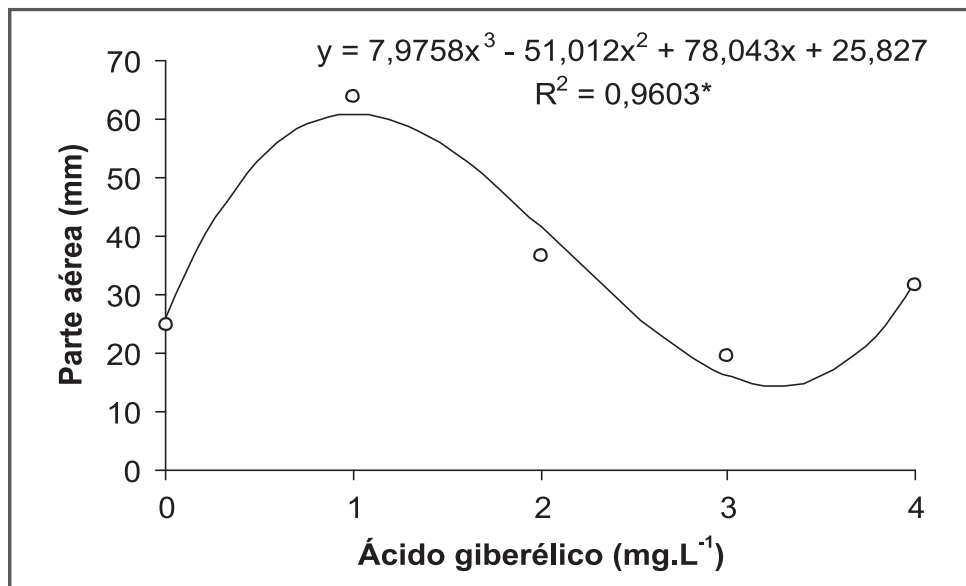
Fonte: dados da pesquisa.

Para o número de entrenós a adição de ácido giberélico (AG_3) no meio de cultura não influenciou de forma significativa ($p > 0,05$). Para o comprimento da parte aérea houve diferenças. Observa-se no Gráfico 2 que o AG_3 mostrou-se eficiente no crescimento dos brotos até a concentração de $1,0\text{mg.L}^{-1}$, acima desta e até $2,0\text{mg.L}^{-1}$ houve declínio do comprimento da parte aérea, indicando efeito inibidor. Resultado semelhante foi observado para o copo-de-leite (RIBEIRO et al., 2009). Entretanto, a mandiоquinha-salsa (MADEIRA et al., 2005) e ameixeira (ROCHA et al., 2009) apresentaram resposta linear à adição deste hormônio.

Os resultados obtidos e a análise da curva de regressão cúbica para o comprimento da parte aérea (Gráfico 2) demonstram que a partir da concentração de $3,0\text{mg.L}^{-1}$ existiu aumento novamente do comprimento da parte aérea. A análise das curvas de regressão do número de folhas (Gráfico 1) indica que a partir de $3,0\text{mg.L}^{-1}$ existe incremento, também, desse parâmetro, bem

como, menor desenvolvimento da parte radicular (Gráfico 3). Portanto, é possível que a pimenta longa no cultivo *in vitro* com o uso de AG_3 nas concentrações acima de $3,0\text{mg.L}^{-1}$ desenvolva a parte aérea (comprimento do caule e número de folhas) em relação à parte radicular, ou seja, uma estratégia de redirecionamento de gasto energético e fotoassimilados. Para tanto, a quantidade de receptores de AG_3 localizados na parede das membranas celulares, nas concentrações entre 2,0 e $3,0\text{mg.L}^{-1}$ deve estar reduzida, e novamente aumentados os receptores acima de $3,0\text{mg.L}^{-1}$ nas células do entrenós e das gemas foliares. A regulação hormonal envolve a percepção do sinal por receptores e a consequente transdução. A variação no número de receptores e sua distribuição, durante o desenvolvimento, podem alterar a sensibilidade das células aos hormônios ou outros sinais (BARENDSE; PEETERS, 1995). De acordo com George (1996), o efeito do AG_3 varia conforme a interação existente com outros reguladores de crescimento, e da espécie que está sendo micropropagada.

Gráfico 2 - Respostas fisiológicas com relação ao comprimento da parte aérea em plântulas de *P. hispidinervum* em diferentes concentrações de ácido giberélico (AG_3).



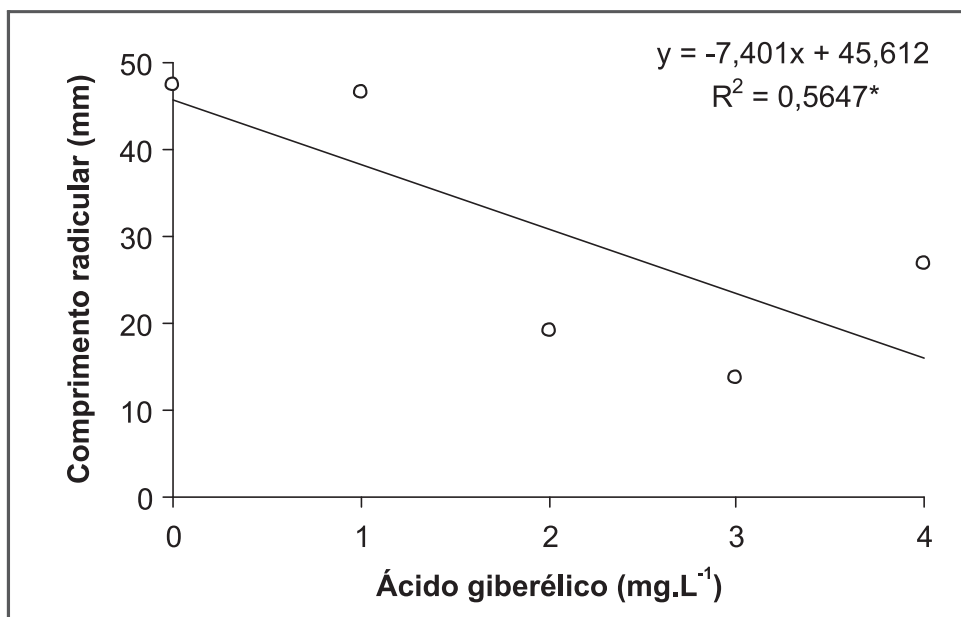
Fonte: dados da pesquisa.

O comprimento das raízes adventícias nas plântulas de pimenta longa também foi significativamente menor ($p < 0,05$) nos tratamentos com AG_3 (Gráfico 3). Os resultados indicam que quanto maior a concentração de AG_3 menor o comprimento das raízes, expresso pela análise de regressão com equação linear e com coeficiente de determinação (r^2) de 0,56. Os dados encontra suporte nos trabalhos de Carvalho et al. (1998), Villa et al. (2008) e Reis et al. (2009) que obtiveram maior comprimento de raízes de paricá, de cafeeiro cv. acaia e de amoreira-preta (*Rubus* spp.), respectivamente, nos tratamentos sem a utilização de AG_3 . De acordo com Kochba et al. (1974) a utilização do ácido giberélico aplicado em concentrações elevadas, impede a formação de raízes. Tal resposta fisiológica em termos de comparação do maior crescimento de caule e menor de raiz pode estar relacionada à estratégia do vegetal de canalizar o gasto energético e de fotoassimilados para o crescimento apenas da parte aérea.

O crescimento do caule das plantas pode ser significativamente maior sob efeito de giberelinas (KERBAUY, 2008), porém as mesmas apresentam pouco efeito no crescimento da raiz (TAIZ; ZEIGER, 2009). Ainda de acordo com os mesmos autores, a aplicação de giberelinas na parte aérea de algumas plantas promove o crescimento tanto do caule como da raiz, porém ainda não se sabe se o efeito no crescimento da raiz é direto ou indireto. De acordo com Kerbauy (2008), existem fortes evidências experimentais de que as giberelinas juntamente com as auxinas promovam expansão celular por exercerem efeitos sobre a parede celular. Mas a relação entre esses dois hormônios quanto a esse fenômeno, ainda, é controversa.

Os elevados valores de r^2 para os parâmetros testados e níveis de regulador de crescimento em pimenta longa expressam confiabilidade nas trajetórias, uma vez que para esses sistemas *in vitro* consideram-se altos os valores de r^2 compreendidos entre 0,5 e 0,9 (COMPTON, 1994).

Gráfico 3 - Respostas fisiológicas com relação ao comprimento do sistema radicular em plântulas de *P. hispidinervum* em diferentes concentrações de ácido giberélico (AG_3).



Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados obtidos indicam que o ácido giberélico em plantas de pimenta longa cultivadas *in vitro* estimula o maior investimento na parte aérea do que no sistema radicular. Quando este foi adicionado ao meio de cultura resultou em aumento da parte aérea nas plantas de pimenta longa no cultivo *in vitro*, devido à expansão celular que esse hormônio

induz (TAIZ; ZEIGER, 2009). Assim, a adição de ácido giberélico (AG₃) ao meio de cultura é vantajosa para o cultivo *in vitro* de pimenta longa, pois essa planta apresenta internódios curtos, o que dificulta sua contagem e sua separação para as demais etapas da micropropagação, como a multiplicação e os subcultivos.

4 CONCLUSÕES

- O uso de 1,0 mg.L⁻¹ de ácido giberélico em brotos de pimenta longa (*Piper hispidinervum*), cultivados *in vitro*, induziu o maior alongamento caulinar.

- Concentrações de ácido giberélico maiores que 1,0 mg.L⁻¹ inibiram o crescimento de raízes adventícias no cultivo *in vitro* de pimenta longa.

REFERÊNCIAS

- ALVES, C.; OLIVEIRA, J. R.; REIS, E. S.; CORRÊA, R. M.; SOUZA, J.; SILVA, J. C. O.; PAULA, J. C. R.; RODRIGUES, L. H. F.; SOUZA, M. A.; MENDONÇA, M. R. A cultura de tecidos na agricultura. In: JORNADA CIENTÍFICA, 1.; FIPA DO CEFET, 6., 2008, Bambuí. **Anais...** Bambuí: CEFET, 2008. Disponível em: <http://www.cefetbambui.edu.br/str/artigos_aprovados/Ci%C3%A4ncias%20Agrarias/14-PT-12.pdf>. Acesso: 01 out. 2010.
- BARENDSE, G. W. M.; PEETERS, T. J. M. Multiple hormonal control in plants. **Acta Botanica Neetherland**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 3-17, 1995.
- BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 160, p. 268-282, 1937.
- BERGO, C. L.; MENDONÇA, H. A.; SILVA, M. R. Efeito da época e frequência de corte de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) no rendimento de óleo essencial. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 35, n. 2, p. 111-117, 2005.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; ANTUNES, L. E. C.; SILVA, A. T. Efeito do ácido giberélico e benzilaminopurina no crescimento *in vitro* de embriões do cafeeiro cv. Acaiá. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 33, n. 6, p. 847-851, 1998.
- COMPTON, M. Statistical methods suitable for analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tissue and Organ Culture, Dordrecht**, v. 37, p. 217-242, 1994.
- DAGNINO, D. S.; CARELLI, M. L. D.; ARRABAL, R. F.; ESQUIBEL, M. A. Efeito do ácido giberélico sobre a regeneração de *ipomoea batatas* a partir de cultura de meristemas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 2, p. 259-262, 1991.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: the technology part 1**. Edington: Exergetics, 1996.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KOCHBA, J.; BUTTON, J.; SPIEGEL-ROY, P.; BORNMAN, C. H.; KOCHBA, M. Stimulation of rooting of citrus embryoids by gibberelic acids and adenine sulphate. **Annals of Botany**, Oxford, v. 38, p. 795-802, 1974.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **The International plant propagators society**, Carlisle, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MACHADO, M. P.; CARVALHO, D. C.; BIASI, L. A. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira "marubakaido" em diferentes meios de cultivo e concentrações de ácido giberélico. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 69-72, 2004.
- MADEIRA, N. R.; TEIXEIRA, J. B.; ARIMURA, C. T.; JUNQUEIRA, C. S. Influência da concentração de BAP e AG₃ no desenvolvimento *in vitro* de mandioquinha-salsa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, n. 4, p. 982-985, out./dez. 2005.
- MELLO-FARIAS, P. C.; PETERS, J. A.; NAKASU, B. H. Micropropagação de porta-enxerto de pereira, "old home" x "farmingdale" 9. **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, v. 2, n. 1, p. 71-78, 1996.

MROGINSKI, L. A.; ROCA, W. M. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In: ROCA, W. M.; MROGINSKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura**: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 1991. p. 19-40.

PEREIRA, R. C. A.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CASTRO, E. M.; SILVA, F. G. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento *in vitro* de *Uncaria guianensis* (AUBLET) Gmelin Rubiaceae (UNHA-DE-GATO). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 637-642, jul./ago. 2006.

REIS, I. N. R. S.; LAMEIRA, O. A.; CORDEIRO, I. M. C. C.; CASTRO, C. V. B.; CARNEIRO, A. G. Cultivo *in vitro* de eixos embrionários de paricá. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 60-66, jan./fev. 2009.

RIBEIRO, M. N. O.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; CAVALLARI, L. L. Desenvolvimento *in vitro* de copo-de-leite: efeito das concentrações de sacarose a ácido giberélico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 575-580, jul./set. 2009.

ROCHA, P. S. G.; SCHUCH, M. W.; BIANCHI, V. J.; FACHINELLO, J. C. Multiplicação e alongamento *in vitro* do porta-enxerto de Prunus. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 2, p. 69-74, Mar./Apr. 2009.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Oxford, v. 52, n. 3-4, p. 591-611, 1965.

SILVA, A. C. P. R.; OLIVEIRA, M. N. **Caracterização botânica e química de três espécies do gênero Piper no Acre**. Rio Branco: Embrapa, 2000. (Boletim de Pesquisa nº 23). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/495193/1/bp23.pdf>>. Acesso em: 01 out. 2012.

SILVA, T. L. da. **Micropropagação, indução da calogênese e estratégias de conservação *ex situ* de Piper aduncum L. e Piper hispidinervum C.DC. por técnicas de crescimento mínimo e temperaturas subzero e criogênicas**. 2010. 153 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de planta**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

THOMAZINI, M. J. **Levantamento da entomofauna associada à pimenta longa no estado do Acre**. Rio Branco: Embrapa, 1999. (Embrapa Acre. Pesquisa em Andamento, 143).

VILLA, F.; PASQUAL, M.; ASSIS, F. A.; PIO, L. A. S.; ASSIS, G. A. de. Crescimento *in vitro* de amoreira-preta: efeito de reguladores de crescimento e da cultivar. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1754-1759, nov./dez. 2008.

